Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. K. Lohmann

Kinetische Untersuchungen an der Methylglyoxalase

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
genehmigt von der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Berlin

Von
Herbert Petrovicki
aus Wien

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 1939

Tag der Promotion: 1. November 1939

Berlin 1939

N 84

Referenten: Prof. Dr. K. Lohmann

Prof. Dr. P. A. Thiessen

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderabdruck aus „Biochemische Zeitschrift", Band 303, Heft 3/4

Verlag von Julius Springer in Berlin

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550804_0244

I.

Nach *Lohmann* (1) wirkt das reduzierte Glutathion als Co-Ferment der Methylglyoxalase, die die enzymatische Umwandlung des Methylglyoxals in Milchsäure bewirkt.

Dieses Ferment, das von seinen Entdeckern *Neuberg* als Ketonaldehydmutase, von *Dakin* und *Dudley* als Glyoxalase bezeichnet wurde, kommt in fast allen tierischen und pflanzlichen Zellen in großer Menge vor. Auf Grund dieser Beobachtung hatte *Neuberg* das Methylglyoxal in den Mittelpunkt seiner Theorie über den biologischen anaeroben Abbau der Kohlenhydrate gestellt, eine Anschauung, die nach *Lohmann* (l. c.) in dieser Form aber nicht zutreffen konnte, da auch in Abwesenheit von Glutathion (wenn also die Methylglyoxalase nicht wirksam ist) Kohlenhydrat mit unveränderter Geschwindigkeit fermentativ in Milchsäure aufgespalten wird.

Die kinetische Untersuchung der Methylglyoxalase hatte weiterhin die Besonderheit ergeben, daß der Umsatz des Methylglyoxals linear verläuft, und daß er in dem gemessenen Bereich auch von der Konzentration des zugesetzten Methylglyoxals unabhängig war. Daher bezeichnete *Lohmann* die Reaktion als Reaktion nullter Ordnung.

II.

Ein der Zeit proportionaler Umsatz findet sich häufig bei fermentativen Umsetzungen. Die enzymatische Aufspaltung der Kreatinphosphorsäure (2) in Kreatin und Phosphorsäure ist ein ausgeprägtes Beispiel. Die Ursache für den linearen Kurvenverlauf konnte dahin aufgeklärt werden, daß das bei der Reaktion als Co-Ferment wirkende Adenylpyrophosphat, das nur in sehr geringer Menge zugesetzt wird, in einer ersten verhältnismäßig langsamen Reaktion zu Adenosindi- bzw. Adenosinmonophosphorsäure dephosphoryliert wird, die sich dann ihrerseits in einer sehr schnellen Reaktion fermentativ mit Kreatinphosphorsäure unter Rückbildung von Adenylpyrophosphorsäure umsetzen. Die Geschwindigkeit dieser Reaktionsfolge ist also begrenzt durch die Dephosphorylierung der Adenylpyro-

phosphorsäure als der langsamsten Reaktion, wodurch eine stets konstante Konzentration an einem Zwischenprodukt vorhanden ist, da sich die Geschwindigkeiten der beiden Reaktionen um etwa das 100fache unterscheiden. Der Umsatz der Kreatinphosphorsäure verläuft ebenfalls unabhängig von der Substratkonzentration.

Ein derartiger Reaktionsverlauf über eine langsam entstehende und sehr rasch zerfallende Zwischenverbindung konnte auch bei der Methylglyoxalase erwartet werden. In der Tat haben mehrere Forscher [(3) bis (12)] auf Grund ihrer kinetischen Arbeiten eine mercaptalartige Verbindung als Zwischenprodukt postuliert, da Glutathion und Methylglyoxal schon bei neutraler Reaktion und Zimmertemperatur in wässeriger Lösung (nichtfermentativ) miteinander zu reagieren vermögen. Das von *Schubert* (13) isolierte Halbmercaptal wird jedoch, wie wir jetzt fanden, durch Methylglyoxalase nicht umgesetzt (Tabelle VI). Auch eine andere Verbindung, die chemisch als dissoziierende Verbindung entsteht [*Girsavicius* (6)], kann auf Grund unserer kinetischen Messungen nicht als Zwischenprodukt angesehen werden. Denn nach diesen Versuchen können nur solche Verbindungen als Zwischenprodukt fungieren, an deren Bildung das Ferment selbst beteiligt ist. Als mutmaßliche Zwischenprodukte wurden von uns Milchsäurealdehyd, ferner auch Brenztraubensäure und Acrylsäure sowohl mit oxydiertem wie mit reduziertem Glutathion als Co-Ferment untersucht. Diese Verbindungen wurden aber nicht umgesetzt.

Ein weiteres Beispiel für jenen linearen Kurvenverlauf hat schon *Knaffl-Lenz* (14) in der Spaltung von Äthylbutyrat (nicht von anderen Estern) durch Leberlipase gefunden. Obwohl die dort angeführten Tabellen noch kein ganz eindeutiges Bild geben, deutet *Knaffl-Lenz* bereits den gelegentlich erhaltenen linearen Kurvenverlauf dahin, daß jeweils nur sehr wenig Substrat an das Ferment gebunden wird, während der Hauptteil in zur gebundenen Menge konstantem Überschuß in der Lösung vorliegt. *S. Arrhenius* (15) schließt sich dieser Ansicht an und folgert sogar daraus, daß der lineare Kurvenverlauf der für enzymatische Reaktionen normale sei.

Die von *P. Rona* und *Lasnitzki* (15) als Reaktion nullter Ordnung beschriebene Spaltung von Tributyrin durch Serumlipase (16) fällt nicht unter die erwähnten Reaktionen. Der geradlinige Kurvenverlauf ergab sich in den *Rona*schen Versuchen nur mit 0,1 bis 1 % Trybutyrin, wo das Tributyrin nicht vollständig gelöst ist. Hier ist also durch das Nachlösen des gespaltenen Tributyrins aus dem nichtgelösten die Substratkonzentration konstant gehalten. Ob auch die enzymatische Dehydrierung von Lactat durch B. coli (17) sowie die Dehydrierung von Äthylalkohol mittels Sauerstoff durch Hefe (18) unter die Reaktionen nullter Ordnung zu zählen sind, muß insofern überprüft werden, als diese Umsetzungen in makroheterogenen Systemen verlaufen und hier u. a. Diffusionsprozesse des Sauerstoffs die Geschwindigkeit der chemischen Reaktionen überlagern können. Jedenfalls zeigen auch diese Reaktionen einen linearen, substratunabhängigen Kurvenverlauf. Viele Atmungen und Gärungen und gelegentlich auch amylatische Spaltungen verlaufen der Zeit proportional. Hier wird die Reaktionsgeschwindigkeit des ganzen Systems ebenfalls durch physikalische Prozesse wie Diffusion usw. bedingt, oder chemisch durch eine langsamste Reaktion beim Umsatz eines Zwischenprodukts.

Schließlich ist auf die enzymatische Spaltung der anorganischen Pyrophosphorsäure durch Muskelextrakt bei Mg-Zusatz hinzuweisen (2a), die bei maximaler Mg-Konzentration ebenfalls linear verläuft. Die maxi-

male Mg-Konzentration wird durch das Äquivalenzverhältnis 2 Mg^{++} zu 1 $P_2O_7^{++++}$ bestimmt. Ein ionales Verhältnis bedingt somit den geradlinigen Reaktionsablauf.

Ein Vergleich der Reaktion nullter Ordnung bei enzymatischen Umsetzungen mit den Vorstellungen der anorganisch-chemischen Katalyse über die Reaktionen nullter Ordnung liegt nahe: Die Oberfläche des Katalysators ist bis zur Sättigung mit Substrat beladen, die Substratkonzentration der Lösung bzw. des Gasraumes jedoch wird der Ordnungsbeziehung zugrunde gelegt und von dieser ist nun der Reaktionsverlauf unabhängig. Die *Taylor*sche Theorie (19) der aktiven Zentren präzisierte diese Vorstellung durch die Annahme, daß nicht die ganze Katalysatoroberfläche kinetisch wirksam sei, sondern nur bestimmte Stellen als „aktive Zentren". Die Anschauungen über Art und Wirkungsweise dieser Zentren sind noch in voller Entwicklung. Sie wurden vielfach an Reaktionen nullter Ordnung ausgestaltet (20).

Mit den bisher erwähnten enzymatischen Reaktionen stehen diese Vorstellungen also in engem Zusammenhang. Allerdings können sie nur dann zutreffen, wenn die Reaktionsgeschwindigkeit sowohl der Zeit proportional wie auch von der Substratkonzentration unabhängig ist. Indessen wurde bei fermentativen Umsetzungen auch linearer Kurvenverlauf und Substratabhängigkeit beobachtet. So zeigt die von *Willstätter*, *Kuhn* und *Bamann* (21) untersuchte asymmetrische Hydrolyse von Mandelsäureäthylester durch gereinigte Leberesterase bis zu 90 % des Umsatzes einen linearen Verlauf, ist aber trotzdem stark abhängig von der Substratkonzentration. Z. B. beträgt die Erhöhung der Umsatzgeschwindigkeit bei Vergrößerung der Esterkonzentration auf das Doppelte mehr als 100 %. Die von *P. I. G. Mann* (22) untersuchte Peroxydasewirkung auf Malachitgrün, sowie die von *Bertho* (23) beschriebene Dehydrierung von Äthylalkohol, Acetaldehyd und Isopropylalkohol mittels Chinon durch Essigbakterien weisen dieselbe Erscheinung auf. *Bertho* erklärt diese durch Hinweis auf die „große Affinität des Enzyms zum Substrat". Wie schon betont, kann diese Erklärung ausschließlich einen *substratunabhängigen* Kurvenverlauf verständlich machen, nicht aber einen *substratabhängigen* Verlauf.

In den beiden von *Lohmann* beschriebenen Reaktionen nullter Ordnung, nämlich der Kreatinphosphorsäurespaltung und der Umwandlung von synthetischem Methylglyoxal in Milchsäure ist nun, über ein bestimmtes Bereich wenigstens, die von obiger Erklärung geforderte Unabhängigkeit von der Substratkonzentration gewahrt. Da, wie weiterhin gezeigt wird, die Reaktion der Methylglyoxalase auch ein Bereich aufweist, in dem Substratabhängigkeit vorliegt (bisher unveröffentlichte Versuche *Lohmanns* hatten schon früher dieses Ergebnis aufgezeigt), so erwies sich ein Studium der Kinetik für die Untersuchung jenes Effekts sehr geeignet.

Da bekanntlich der Reaktionsablauf der Fermente durch Begleitkörper oft in verschiedenster Weise beeinflußt wird, wurde eine gereinigte Methylglyoxalase hergestellt. Wässerige rohe Zellextrakte ließen sich um das gut 100fache reinigen.

Bei 28,4° C setzten 2,8 γ Protein in 10 Minuten 150 γ Methylglyoxal bei einer Aktivierung mit 100 γ Glutathion in einem Flüssigkeitsvolumen von 1,6 ccm um. Dies entspricht der etwa sechsfachen Gewichtsmenge Methylglyoxal pro Minute bei etwa 30 %iger Aktivierung und untermaximaler Methylglyoxalkonzentration. Dies ist in der Größenordnung gleich der Wirkung kristallisiert erhaltener Fermente, die organische Substanzen umsetzen.

III.

Als Ergebnis der kinetischen Messungen an dem gereinigten Ferment sei hier kurz erwähnt, daß der Umsatz ebenso wie bei rohen Fermentpräparaten der Zeit proportional ist (Tabelle I), daß er mit der Glutathionkonzentration bei gleicher Apo-, Ferment- und Substratkonzentration anfangs rasch und später langsamer ansteigt, bis eine maximale Glutathionkonzentration erreicht ist (Abb. 1), daß bei maximaler Glutathionkonzentration die Umsatzgeschwindigkeit dem Lösungsvolumen nahezu umgekehrt proportional ist, bei untermaximaler Glutathionkonzentration von dem Lösungsvolumen aber weniger stark abhängt (Tabelle II), und daß der Temperaturquotient wie beim rohen Ferment 2,75 ist (Tabelle III).

Zur eingehenden Diskussion steht der Befund, daß bei einem bestimmten Verhältnis der Glutathion- zur Apo-Fermentkonzentration die Umsatzgeschwindigkeit unabhängig von der Substratkonzentration ist, und zwar in einem Bereich von mindestens 1 bis etwa 32. Oberhalb dieses Verhältnisses besteht Substratabhängigkeit. Der Bereich kleiner als 1 ist experimentell nicht faßbar. Substratunabhängigkeit besteht bis zu vierfacher Veränderung der Substratkonzentration. Sehr viel höhere Konzentrationen an Methylglyoxal konnten wegen der Giftigkeit nicht geprüft werden.

Zur Deutung dieser Versuchsergebnisse nehmen wir an, daß sich, wie an den anorganischen Katalysatoren auch, an der Apo-Fermentoberfläche aktive Zentren befinden (24), und daß sich daran die Glutathionmoleküle (Co-Fermentmoleküle) anlagern. Die hierdurch umgestaltete Oberfläche kann nun an einer neuen Art von Zentren mit den Substratmolekülen in Reaktion treten. Eine Verdrängung des Substrats durch das Co-Ferment oder umgekehrt konnten wir nie feststellen, infolgedessen können die aktiven Zentren, an denen sich das Glutathion befindet, und jene, die Methylglyoxal anlagern, nicht die gleichen sein. Um den geradlinigen Kurvenverlauf sowohl bei Substratunabhängigkeit wie auch im substratabhängigen Gebiet erklären zu können, entwickeln wir die Anschauung, daß der lineare

Verlauf durch jeweils vollständige Sättigung der aktiven Zentren des Enzyms mit Substrat hervorgerufen wird. Unter bestimmten Bedingungen im substratabhängigen Bereich muß dem Substrat jedoch die Fähigkeit zugeschrieben werden, die Leistung der aktiven Zentren zu erhöhen, und zwar so, daß diese Leistung auch dann erhalten bleibt, wenn schon ein Großteil des Substrats umgesetzt ist. Auf die kinetische Leistung der aktiven Zentren bezogen, werden daher unter dem Einfluß des Substrats neue aktive Zentren am Ferment ausgebildet. Da, wie früher dargelegt, die Erscheinung des substratabhängigen linearen Verlaufs in den verschiedensten Fermentsystemen aufzufinden ist, liegt darin wohl nicht ein durch irgendeine Besonderheit der Fermentoberfläche bedingter Sonderfall vor, sondern wir beobachten hier den experimentell faßbaren Übergang einer Reaktionsmöglichkeit in eine andere. Bei den Fermenten (wie bei der Lipase), deren Wirkgruppe nicht abgetrennt werden kann (bzw. bisher nicht abgetrennt ist), haben wir den ganz allgemeinen Fall vor uns, wie bei der Methylglyoxalase bei maximaler Glutathionkonzentration, wo ebenfalls zumeist Substratabhängigkeit besteht. Deshalb gewähren diese Untersuchungen an den vollständigen Fermenten, wie der Lipase oder der Methylglyoxalase bei maximaler Glutathionkonzentration, nur einen schmalen Einblick in den durch ein gegebenes, oft unbekanntes Verhältnis bedingten Reaktionsablauf. Von diesem Gesichtspunkt aus sind alle bisherigen Angaben über Substratabhängigkeit, direkte Proportionalität nach der Fermentkonzentration, deren Quadratwurzel und anderes mehr zu werten.

Die Tatsache, daß der oben angeführte Übergang von der Substratunabhängigkeit in Abhängigkeit besteht, läßt folgern, daß die Fermentoberfläche zwar strukturell aufgebaut und mit vorgebildeten aktiven Zentren ausgestattet ist, daß aber für ein Ferment viele eindeutige Strukturmöglichkeiten bestehen, die sich von einem Grundzustand aus entwickeln können. Die wirksame Fermentoberfläche ist nicht starr ausgebildet, sie besitzt Reaktionsmöglichkeiten, die unter dem Einfluß der Reaktionspartner zur Geltung gebracht werden können. Es muß betont werden, daß jene Gegebenheiten nicht in Beziehung gesetzt werden dürfen zu den vielfach beobachteten Aktivierungen von Fermenten durch bestimmte Zusätze, die während der Reaktionsdauer ihre Konzentration nicht ändern. Eine derartige Verstärkung der aktiven Zentren ist ganz anderer Natur.

Versucht man sich ein Bild von dem Übergang des substratunabhängigen in den substratabhängigen Bereich zu machen, so kann man vielleicht annehmen, daß infolge einer „Auflockerung" der wirksamen Fermentoberfläche durch Glutathion und Methylglyoxal weitere, bisher nicht an der Oberfläche liegende aktive Zentren „eröffnet" werden. Die einmal verursachte Veränderung des Ferments bleibt auch dann bestehen, wenn das Methylglyoxal bereits zum Großteil umgesetzt ist. Vielleicht ist es aber

nicht erforderlich, die erhöhte kinetische Leistung auf ein zahlenmäßiges Anwachsen der aktiven Zentren zurückzuführen, vielmehr kann diese auch durch einen verschiedenen Dispersionsgrad der Fermentmoleküle erklärt werden, wenn man annimmt, daß bisher unwirksame Fermentteilchen sich mittels bestimmter chemischer Gruppen an die die aktiven Zentren tragenden Fermentmoleküle anlagern, ohne diese zu blockieren, und daß dadurch deren Leistung im Sinne einer Erniedrigung der Aktivierungsenergie erhöht wird. —

Nahm man bisher an, daß das Substrat auf den Ablauf von Fermentreaktionen in der Weise einwirke, daß es an ihnen passiv nur infolge seiner Affinität und aktiv allenfalls nur mit seinen Umsatzprodukten beteiligt sei, so scheint aus diesen Versuchen hervorzugehen, daß das Substrat unmittelbar aktiv in die Struktur der Fermente einzugreifen vermag. Es muß dahingestellt bleiben, in welchem Grade diese beiden Möglichkeiten der Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit bei einzelnen Fermenten nebeneinander bestehen oder ineinandergreifen. Es ist hier zu erwägen, ob in dem bei sehr vielen Fermenten aufgefundenen Kurvenverlauf zwischen erster und nullter Ordnung der experimentelle Ausdruck für das Wiederverschwinden der durch Substrateinwirkung aktiv gemachten Zentren zu sehen ist.

Arrhenius' (15) Auffassung, der Reaktionsverlauf aller Enzymreaktionen gehe nach der nullten Ordnung, wurde in der experimentellen und mathematischen Bearbeitung fermentativer Fragen bisher nicht genügend beachtet. Diese Anschauung mag im Prinzip zutreffen; der bei den meisten Fermentreaktionen beobachtete andersartige Verlauf wurde bisher erklärt auf Grund der Affinität des Substrats zum Ferment, der Zerstörung des Ferments und der Einwirkung der Spaltprodukte, ohne daß aber eine befriedigende mathematische Formulierung, die über einen Einzelfall hinausging, möglich war. Dazu kommen noch die Zusammenhänge, die zwischen der [H˙] und der Fermentkonzentration bestehen. Darüber hinaus müssen noch weitere Faktoren im Spiele sein, und einer der wesentlichsten Faktoren mit ist sicher die unmittelbare Einwirkung des Substrats auf das Ferment, d. h. eine Wechselwirkung zwischen Ferment und Substrat.

Von einer Berechnung der Aktivierungsenergie der Methylglyoxalase wurde abgesehen. Die in der Fermentliteratur gemachten Angaben verlieren meist ihre Bedeutung, da die „wahre" Aktivierungsenergie nur an Reaktionen nullter Ordnung direkt gemessen werden kann. Die Genauigkeit der bisher angeführten Messungen an Fermentreaktionen geht aber nicht über eine qualitative Aussage der Erniedrigung der Aktivierungsenergie hinaus.

Es ist ungewiß, inwieweit sich die in vitro herausgeschälten Verhältnisse in der Vielfalt des Organismus erfüllen und ob daher der Übergang von Substratabhängigkeit zu Substratunabhängigkeit für den Stoffwechsel von Wichtigkeit ist. Es kann darin eine Anpassungsfähigkeit der normalen Zelle zur Bewältigung verschieden großer Substratmengen in kürzerer Zeit gesehen werden.

V.

Die Fermentreinigung.

Bisher (9) wird eine etwa achtfache Reinigung der Methylglyoxalase angegeben.

Eine gut 100fache Reinigung eines Rohextrakts wurde auf folgendem Wege erhalten:

1. Extraktion des Ferments aus dem Gewebe mit destilliertem Wasser und Ausfällung von unwirksamem Eiweiß bei schwach saurer Reaktion.

2. Ausfällung des wirksamen Fermenteiweißes durch fraktioniertes Aussalzen mit Ammonsulfat.

3. Fraktionierte Fällungen mit Aceton und fraktioniertes Lösen der Niederschläge in Wasser.

Beispiel zu 1.:

Ganz frische Kalbsleber durch eine Fleischmaschine drücken, den Brei mit dem doppelten Volumen eisgekühlten dest. Wassers versetzen und mit Quarzsand zerreiben. Den Extrakt bei 5000 Touren abzentrifugieren und 500 ccm von diesem Rohextrakt eiskalt mit 50 ccm $^1/_3$ n Acetat-Essigsäure-Puffer 1 : 1 unter Rühren versetzen und den Niederschlag abzentrifugieren (7000 Touren). Ausbeute 490 ccm Extrakt. Unter Kühlung und Rühren mit 30 ccm 5 %igem $NaHCO_3$ neutralisieren (Lösung I).

Beispiel zu 2. (Ammonsulfatfällung):

500 ccm Lösung I sofort mit 450 ccm eisgekühlter, gesättigter Ammonsulfatlösung unter Rühren fällen (45 %ige Sättigung) und den wenig wirksamen Niederschlag rasch bei 7000 Touren abzentrifugieren. Ausbeute 830 ccm Lösung. Rasch 1000 ccm gesättigte kalte Ammonsulfatlösung zugeben (75 %ige Sättigung), den wirksamen Niederschlag abzentrifugieren. In 100 ccm dest. Wasser lösen und über Nacht auf Eis aufbewahren (Lösung II).

Beispiel zu 3. (Reinigung über Acetonfällungen):

Zu 50 ccm Lösung II 25 ccm Aceton unter Kühlung zusetzen, bei 3000 Touren abzentrifugieren, die Lösung 45 Minuten in Eiskochsalzmischung stehenlassen und ausfallende Flocken abzentrifugieren. Die Lösung mit 12,5 ccm eiskaltem Aceton langsam versetzen, 5 Minuten in Eis stehenlassen und den weniger wirksamen Niederschlag abzentrifugieren. Die obere acetonische Lösung abtrennen und mit weiteren 30 ccm Aceton den Hauptteil an Ferment ausfällen, den Niederschlag in 30 ccm Wasser suspendieren und mehrere Stunden in Eiskochsalz gefrieren lassen und nach dem Auftauen durch Zentrifugieren klären. Der Hauptteil des Ferments befindet sich in der Lösung (Lösung III).

20 ccm Lösung III mit 60 ccm dest. Wassers verdünnen, einige Minuten auf Eis stehenlassen und nun mit 60 ccm gekühltem Aceton versetzen. Über Nacht auf Eiskochsalz stehenlassen, hierauf die Suspension abzentrifugieren, die wirksame Lösung mit 100 ccm Aceton fällen, 45 Minuten kalt stehenlassen, den wirksamen Niederschlag abzentrifugieren und in 20 ccm dest. Wassers lösen. Die Suspension mehrere Stunden in Eiskochsalzmischung stehenlassen, wieder langsam auftauen und bei 15000 Touren abzentrifugieren. Die klare Lösung in gefrorenem Zustand auf Eiskochsalz aufbewahren (Lösung IV).

Sie ist in gefrorenem Zustand bis zu 8 Tagen unverändert haltbar. In 50% Glycerinlösung aufbewahrt ist die Haltbarkeit größer. Nach 3 Wochen betrug die Abnahme der Aktivität hier 30%.

Eine weitere Reinigung gelang nicht, da das Ferment in diesem Zustand sowohl gegenüber verschiedenen Neutralsalzen wie auch organischen Lösungsmitteln überaus empfindlich ist. Versucht wurde in verschiedenen Kombinationen u. a. Aussalzen mit $(NH_4)_2SO_4$, Ausfällung mit Aceton, Dioxan, Alkohol, Änderungen des p_H, Fällungen mit Schwermetallsalzen.

Die hohe Empfindlichkeit zeigte sich auch in der größeren Schädigung durch Erwärmen als dies bei Rohextrakten der Fall ist. Auch längeres Stehen macht das Ferment temperaturempfindlicher.

Die Bestimmung des Reinheitsgrades erfolgte durch Messung der Fermentwirksamkeit unter Bezugnahme auf den Stickstoffgehalt.

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades definieren wir als Fermenteinheit die Enzymmenge, die bei der Methylglyoxalkonzentration 1,0 mg und der Glutathionkonzentration 0,1 mg in einem Flüssigkeitsvolumen von 1,6 ccm bei p_H 7,5 pro Minute 1 ccm CO_2 entwickelt. Unter Fermentwirksamkeit (FW) verstehen wir Fermenteinheiten (E) pro mg Trockensubstanz. Das Verhältnis der Fermentwirksamkeiten des ursprünglichen Extrakts zum gereinigten Ferment ist unser Reinheitsgrad.

Z. B. FW Rohextrakt = 7,5, FW gereinigt = 804. Reinheitsgrad > 100. Die Ausbeute an dem so gereinigten Ferment betrug 2%. Die Reinigung war bei genauer Innehaltung der Vorschrift gut reproduzierbar.

VI.

Beschreibung der Versuche.

Zur manometrischen Messung (1) benutzten wir *Warburg*-Gefäße. Die Versuchstemperatur war 28,4° C bei p_H 7,5 (im Bereich der optimalen H-Ionenkonzentration). Die Bicarbonatkonzentration betrug 0,3%. Das Volumen der Reaktionsflüssigkeit im Trog war 1,6 ccm, davon 1,0 ccm gepufferte Fermentlösung und je 0,3 ccm Glutathion- und Methylglyoxallösung, die nach Temperaturausgleich eingekippt wurden. Der Gasraum enthielt 5% CO_2 in N_2. Das Methylglyoxal wurde nach *Neuberg* (25) durch Destillation von Glycerinaldehyd mit Schwefelsäure hergestellt.

Um die in bicarbonatalkalischer Lösung vor sich gehende Reaktion Methylglyoxal—Glutathion auszuschalten, wurden immer Kontrollen ohne Ferment mitgeschüttelt. Bei dieser Reaktion entsprechen nur 20% der gebildeten Gasmenge Milchsäure. 1 mg Methylglyoxal + 1 mg Glutathion entwickeln in 60 Minuten 30 cmm CO_2; bei 0,1 mg Glutathion und 1 mg Methylglyoxal 10 cmm CO_2. In den angeführten Tabellen ist diese chemische CO_2-Bildung bereits in Abzug gebracht. Bei der Prüfung ammonsulfathaltiger Fermentlösungen ist zu beachten, daß mit $(NH_4)_2SO_4$ und Methylglyoxal eine Reaktion unter Gasentwicklung auftritt, die bei 40 mg $(NH_4)_2SO_4$ und 2 mg Methylglyoxal bei p_H 7,5 in 40 Minuten bei 28,4° C 120 cmm Gas entwickelt.

Die Schüttelgeschwindigkeit betrug bei allen Versuchen 120 pro Minute.

Unsere Angaben beziehen sich auf cmm CO_2 bei p = 760 mm und t = 0° C (1 cmm CO_2 = 3,3 g Methylglyoxal).

Wir gebrauchen in den Tabellen die Abkürzungen: *Met* = Methylglyoxal, *Glut* = Glutathion, *E.e* = Extrakt, C_M = Methylglyoxalkonzen-

tration in γ, C_G = Glutathionkonzentration in γ, C_f = Apo-Fermentkonzentration in Einheiten E (siehe oben) oder in γ Protein.

Aus den zahlreichen (152) Versuchen wird nur eine charakteristische Auswahl wiedergegeben.

Versuch 1 (Tabelle I).

Linearer Kurvenverlauf. Die Versuchsansätze entstammen verschiedenen Versuchen, die mit ganz verschiedenen Extrakten bezüglich Herstellung, Aufbewahrung und Reinheitsgrad durchgeführt wurden.

Tabelle I.

Zeit in Min.	Nr. 1 $C_M = 500\,\gamma$ $C_G = 100\,\gamma$	Nr. 2 $C_M = 500\,\gamma$ $C_G = 100\,\gamma$	Nr. 3 $C_M = 2000\,\gamma$ $C_G = 1000\,\gamma$
10	66	62	65
20	127	127	132
30	192	(129)	180
40		—	232

Auch bei verschiedener Methylglyoxal- und Glutathionkonzentration wurde ein der Zeit proportionaler Kurvenablauf mit gereinigtem Ferment aufgefunden, wie er schon früher am weniger gereinigten Ferment erhalten wurde. Versuch Nr. 2 wurde mit einem hochgereinigten Ferment (mit 804 Einheiten pro mg Protein) ausgeführt.

Versuch 2 (Abb. 1).

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Glutathionkonzentration. Die Fermentextrakte stammen von verschiedenen Präparaten.

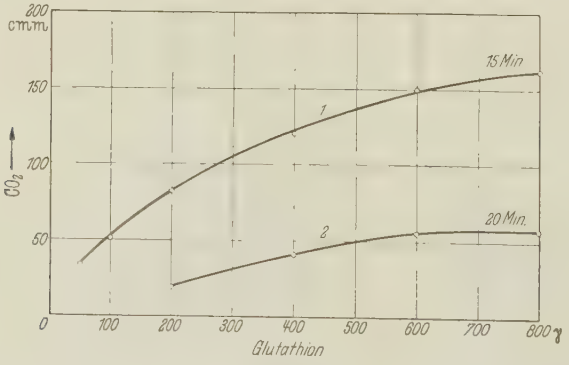

Abb. 1.

Die Kurve 1 zeigt einen kontinuierlichen Anstieg. Direkte Proportionalität besteht nicht. Die Messung wurde hier im substrat-

unabhängigen Bereich begonnen und endet im substratabhängigen Teil (bei 600 γ); es erfolgt daher noch eine Steigerung von 600 bis 800 γ Glutathion. Kurve 2 wurde im substratabhängigen Gebiet gemessen. Das Maximum ist hier bei 600 γ schon erreicht.

Versuch 3 (Tabelle II).

Verschiedene Lösungsvolumina. Diese Versuche wurden mit Rohextrakt ausgeführt.

Tabelle II.

Zeit in Min.	Gesamtvol. 1,3 ccm C_F = 0,02 ccm C_M = 2000 γ		Gesamtvol. 2,6 ccm C_F = 0,02 ccm C_M = 2000 γ	
	C_G = 400 γ	C_G = 1000 γ	C_G = 400 γ	C_G = 1000 γ
10	80	123	49	56
20	170	255	110	121

In 1,3 ccm ist die Geschwindigkeit bei maximaler Glutathionkonzentration 100 %, bei untermaximaler Glutathionkonzentration etwa 50 % größer als in 2,6 ccm.

Versuch 4 (Tabelle III).

Bestimmung des Temperaturkoeffizienten Q_{10}. Die Versuchstemperaturen waren 23,4° C, 28,4° C und 33,4° C.

$$C_F = 8\,\gamma, \quad C_M = 1000\,\gamma, \quad C_G = 1000\,\gamma.$$

Tabelle III.

Temperatur in ° C	cmm CO_2 nach 10 Min.
23,4	24
28,4	43
33,4	66

Der Temperaturkoeffizient beträgt demnach:

$$Q_{10}^{23,4—28,4^\circ\,C} = 2{,}6,$$

$$Q_{10}^{28,4—33,4^\circ\,C} = 2{,}9,$$

$$Q_{10}^{23,4—33,4^\circ\,C} = 2{,}75.$$

Versuch 5 (Tabelle IVa, Tabelle IVb).

Substratunabhängiger Bereich; charakterisiert durch das Verhältnis: Glutathionkonzentration/Fermentkonzentration.

Tabelle IV a.

Zeit in Min.	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5	Nr. 6
	$C_F = 18\,\gamma$ $C_M = 500\,\gamma$ $C_G = 25\,\gamma$	$C_F = 18\,\gamma$ $C_M = 1500\,\gamma$ $C_G = 25\,\gamma$	$C_F = 1{,}2\,\gamma$ $C_M = 500\,\gamma$ $C_G = 25\,\gamma$	$C_F = 1{,}2\,\gamma$ $C_M = 2000\,\gamma$ $C_G = 25\,\gamma$	$C_F = 19\,\gamma$ $C_M = 1000\,\gamma$ $C_G = 400\,\gamma$	$C_F = 19\,\gamma$ $C_M = 2400\,\gamma$ $C_G = 400\,\gamma$
10	**77**	**76**	**30**	**31**	214	218
15					(280)	330
20	**132**	**134**	**66**	**65**		
30	(135)	198	100	96		
40		270	136	130		
	$\frac{C_G}{C_F} \sim 1{,}4$		$\frac{C_G}{C_F} \sim 21$		$\frac{C_G}{C_F} \sim 21$	

Tabelle IV b. Substratabhängiger Bereich.
(Nr. 3 bis 6 sind Doppelversuche.)

Zeit in Min.	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5	Nr. 6
	$C_F = 6\,E$ $C_M = 500\,\gamma$ $C_G = 200\,\gamma$	$C_F = 6\,E$ $C_M = 2000\,\gamma$ $C_G = 200\,\gamma$	$C_F = 1{,}7\,E$ $C_M = 500\,\gamma$ $C_G = 100\,\gamma$	$C_F = 1{,}7\,E$ $C_M = 2000\,\gamma$ $C_G = 100\,\gamma$	$C_F = 10\,E$ $C_M = 500\,\gamma$ $C_G = 1000\,\gamma$	$C_F = 10\,E$ $C_M = 1000\,\gamma$ $C_G = 1000\,\gamma$
10	**22**	**28**	21; 21	43; 47	22; 23	34; 31
20	**45**	**54**	41; 40	88; 88	45; 43	67; 63
30	66	76	64; 60	115; 116	69; 67	98; 98
40	90	99	84; 78	148; 152	85; 82	127; 126
	$\frac{C_G}{C_F} \sim 33$		$\frac{C_G}{C_F} \sim 60$		$\frac{C_G}{C_F} \sim 100$	

Das charakteristische Verhältnis C_G/C_F konnte (nach Tabelle IVa, 1, 2) bis etwa 1 nach unten bestimmt werden. Es besteht, wie 1 und 2 zeigen, keinerlei Abhängigkeit von der Substratkonzentration, die auf das Dreifache erhöht wurde. Nach 3 und 4 (Tabelle IVa) ist auch bei wesentlicher Erhöhung des charakteristischen Verhältnisses keine Abhängigkeit von der Substratkonzentration zu finden, wenn diese auf das Vierfache erhöht wird und das Verhältnis 32 nicht überschritten wird (siehe Tabelle IVb). Wie 5 und 6 (Tabelle IVa) zeigen, bewirken hohe Glutathionkozentrationen allein noch keine Substratabhängigkeit wie von *Platt* und *Schroeder* (10) angegeben wird. Allerdings bedingen hohe Glutathionkonzentrationen bei der manometrischen Messung im *Warburg*-Apparat ein Arbeiten mit niedrigen Fermentkonzentrationen, da die Umsatzgeschwindigkeit sonst zu rasch und daher nicht verfolgbar ist. Deshalb ist dann zumeist der Wert 32 überschritten und die Versuche weisen Substratabhängigkeit auf.

Oberhalb des Verhältnisses $C_G/C_F \sim 32$ herrscht, wie Tabelle IVb 1 und 2 zeigen, bereits Substratabhängigkeit, bei vierfacher Substratkonzentration hier etwa 10 %. Zumeist führten wir Doppelversuche aus.

Aus ihnen kann (siehe 3 bis 6) die Fehlergrenze ersehen werden. In diesen Versuchen beträgt die Steigerung bei $C_G/C_F \sim 60$ (3, 4) fast 100 %, wobei die Substratkonzentration vervierfacht wurde. Nach 5, 6 beträgt die Geschwindigkeitserhöhung bei Verdoppelung der Substratkonzentration und $C_G/C_F \sim 100$ etwa 50 %.

Versuch 6 (Abb. 2).

Linearer Kurvenverlauf im substratabhängigen Gebiet.

$$C_F = 6\ E, \quad C_M = 1500\ \gamma, \quad C_G = 800\ \gamma.$$

$$C_G/C_F \sim 133.$$

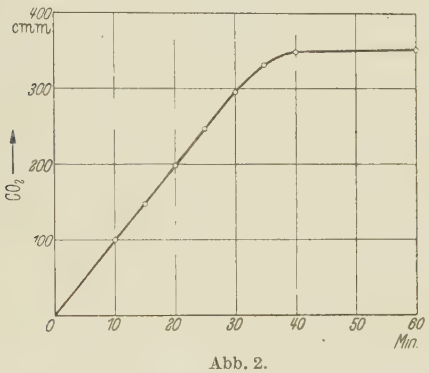

Abb. 2.

Die Umsatzgeschwindigkeit ist auch im Bereich der Substratabhängigkeit bis fast zum völligen Umsatz des Substrats der Zeit proportional.

Versuch 7 (Tabelle V).

Das Verhältnis Methylglyoxalkonzentration/Glutathionkonzentration hat auf den Kurvenverlauf keinen Einfluß.

Tabelle V.

Zeit in Min.	Nr. 1 $C_F = 10\ E$ $C_M = 2000\ \gamma$ $C_G = 2000\ \gamma$	Nr. 2 $C_F = 10\ E$ $C_M = 1000\ \gamma$ $C_G = 1000\ \gamma$	Nr. 3 $C_F = 10\ E$ $C_M = 1000\ \gamma$ $C_G = 1000\ \gamma$	Nr. 4 $C_F = 10\ E$ $C_M = 1000\ \gamma$ $C_G = 2000\ \gamma$
10	54, 52	28, 24	28	24
20	126, 128	65, 61	72	89
30	187, 194	118, 117	112	97
	$\frac{C_G}{C_F} \sim 200$	$\frac{C_G}{C_F} \sim 100$	$\frac{C_G}{C_F} \sim 100$	
	$\frac{C_M}{C_G} \sim 1$	$\frac{C_M}{C_G} \sim 1$	$\frac{C_M}{C_G} \sim 1$	$\frac{C_M}{C_G} \sim \frac{1}{2}$

1 und 2 weisen das gleiche Verhältnis Methylglyoxalkonzentration/Fermentkonzentration = 1 auf, jedoch verschiedene „charakteristische Verhältnisse". Es ergibt sich eine etwa 100%ige Steigerung bei Erhöhung des charakteristischen Verhältnisses auf das Doppelte. Eine Verdoppelung des Verhältnisses Methylglyoxalkonzentration/Fermentkonzentration bei gleichem charakteristischen Verhältnis hat hingegen, wie 3 und 4 zeigen, keinen Einfluß auf die Umwandlungsgeschwindigkeit. Die bei diesen Versuchen verwendete Glutathionkonzentration ist bereits maximal.

Versuch 8 (Tabelle VI).

Das *Schubert*sche Halbmercaptal (13) fungiert nicht als Substrat der Methylglyoxalase.

Tabelle VI. Die Versuchstemperatur betrug hier 25° C.

Zeit in Min.	Nr. 1 $C_F = 6\ E$ $C_M = —$ $C_G = —$ Halbm. in 5400 γ	Nr. 2 $C_F = 2\ E$ $C_M = —$ $C_G = —$ Halbm. in 5400 γ	Nr. 3 $C_F = 6\ E$ $C_M = 1000\ \gamma$ $C_G = 4000\ \gamma$ Halbm. in — γ	Nr. 4 $C_F = 2\ E$ $C_M = 1000\ \gamma$ $C_G = 4000\ \gamma$ Halbm. in — γ
10	32	2	139	56
20	60	19	(238)	120
30	62	19		172

Das *Schubert*sche Halbmercaptal (13) wurde genau nach der Vorschrift durch Mischen konzentrierter Lösungen von Methylglyoxal und Glutathion, teilweisem Einengen und Ausfällen mit Alkohol hergestellt.

Nach den Versuchen 1 und 2 wird dieses Halbmercaptal nicht oder kaum umgesetzt, während dieselben Mengen Glutathion und Methylglyoxal, wie sich aus den Versuchen 3 und 4 ergibt, glatt gepalten werden. Das Halbmercaptal kann also nicht das Zwischenprodukt sein.

Zusammenfassung.

Die Methylglyoxalase, die in nahezu allen Zellen, zum Teil in sehr großen Mengen vorkommt, wandelt Methylglyoxal in Milchsäure um. Das Co-Ferment dieses Ferments ist reduziertes Glutathion. Innerhalb eines bestimmten Verhältnisses der Glutathion- zur Apo-Fermentkonzentration ist die Umsatzgeschwindigkeit unabhängig von der Substratkonzentration. Bei einem weitgehend gereinigten Fermentpräparat lag dieser Bereich zwischen 1 und 32. Der Bereich kleiner als 1 ist experimentell nicht faßbar. Erst bei einem Verhältnis über 32 nimmt die Umsatzgeschwindigkeit mit der Substratkonzentration zu, so daß hier nicht mehr die Bedingung einer Reaktion nullter Ordnung vorliegt, obwohl der Umsatz bei einer gegebenen Methylglyoxalkonzentration selbst der Zeit proportional verläuft. Bei steigenden Glutathionkonzentrationen steigt der Umsatz anfangs rasch und später langsam

bis zu einer maximalen Glutathionkonzentration an. Das Lösungsvolumen ist der Umsatzgeschwindigkeit nahezu umgekehrt proportional.

Um den gradlinigen Kurvenverlauf sowohl im substratunabhängigen wie substratabhängigen Bereich erklären zu können, wird die Anschauung entwickelt, daß der lineare Verlauf der Reaktion durch jeweils vollständige Sättigung der aktiven Zentren des Enzyms mit Substrat hervorgerufen wird. Unter bestimmten Bedingungen im substratabhängigen Bereich muß dem Substrat jedoch die Fähigkeit zugeschrieben werden, die Leistung der aktiven Zentren zu erhöhen, und zwar so, daß diese Leistung auch dann erhalten bleibt, wenn schon ein Großteil des Substrats umgesetzt ist. Auf die kinetische Leistung der aktiven Zentren bezogen, werden daher unter dem Einfluß des Substrats neue aktive Zentren am Ferment ausgebildet. Bei den Holofermenten mit linearem Reaktionsverlauf, aber Substratabhängigkeit (z. B. Lipase), hat man den ganz allgemeinen Fall wie bei der Methylglyoxalase bei maximaler Glutathionkonzentration, wo ebenfalls zumeist Substratabhängigkeit besteht. Hieraus ergibt sich, daß bei einem Ferment von der Art der Methylglyoxalase die wirksame Fermentoberfläche nicht starr ausgebildet ist; sie besitzt vielmehr Reaktionsmöglichkeiten, die u. a. auch durch das Substrat selbst zur Geltung gebracht werden können.

Die Arbeit wurde auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn Professor *Lohmann* ausgeführt, dem ich herzlich danke.

Literatur.

1) *K. Lohmann*, diese Zeitschr. **254**, 332, 1932. — 2) *Derselbe*, ebenda **271**, 264, 1934; **262**, 147, 1933. — 3) *M. Jowett* u. *J. Quastel*, Biochem. J. **27**, 486, 1933. — 4) *J. O. Girsavicius*, ebenda **25**, 1807, 1931. — 5) *Derselbe*, diese Zeitschr. **260**, 278, 1933. — 6) *J. O. Girsavicius* u. *Heyfetz*, ebenda **276**, 190, 1935. — 7) *J. O. Girsavicius*, Nature **136**, 645, 1935. — 8) *Derselbe* Fermentforschung **15**, 32, 1936. — 9) *Derselbe*, Ref. Chem. Zentralbl. **1938**, I, 1993. — 10) *M. T. Platt* u. *Schroeder*, J. of biol. Chem. **104**, 285, 1934. — 11) *S. Jamazoye*, J. Biochemistry **23**, 319, 1936. — 12) *Th. Bersin*, Ergebnisse der Enzymforschung **4**, 69, 1935. — 13) *M. P. Schubert*, J. of biol. Chem. **111**, 671, 1935. — 14) *F. Knaffl-Lenz*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **97**, 242, 1923. — 15) *S. Arrhenius*, Zeitschr. f. angew. Chem. **36**, 455, 1924. — 16) *P. Rona* u. *Lasnitzki*, diese Zeitschr. **152**, 504, 1924. — 17) *P. Cook*, Biochem. J. **25**, 534, 1931. — 18) *H. Wieland* u. *Claren*, Ann. **492**, 183, 1931. — 19) *H. S. Taylor*, J. physic. Chem. **30**, 145, 1926; Proc. Roy. Soc., London (A) **108**, 105, 1925. — 20) *G. M. Schwab*, Katalyse vom Standpunkt der chemischen Kinetik, Berlin 1931; *G. M. Schwab* u. *Brennecke*, Zeitschr. f. phys. Chem. **24**, 393, 1935. — 21) *R. Willstätter*, *R. Kuhn* u. *Bamann*, Ber. **61**, 896, 1928. — 22) *P. J. G. Mann*, Biochem. J. **25**, 918, 1931. — 23) *A. Bertho*, Ann. **474**, 1, 1929. — 24) *W. Frankenburger*, Ergebn. d. Enzymforsch. **3**, 1, 1934. — 25) *C. Neuberg*, *Färber*, *Levite* u. *Schwenk*, diese Zeitschr. **83**, 264, 1917.

Lebenslauf

Ich, Herbert Wolfgang Petrovicki, wurde am 5. März 1917 in Wien als Sohn des damaligen Versicherungsprokuristen, derzeitigen Bankbevollmächtigten Gustav Petrovicki und seiner Frau Helene, geboren.

In Wien besuchte ich die Volksschule, legte nach dem Besuch des Robert-Hamerling-Realgymnasiums an demselben im Juni 1935 die Reifeprüfung ab und studierte hierauf an der dortigen Universität 4 Semester Chemie; mein Studium setzte ich ab Herbst 1937 an der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin fort.

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn in Braunschweig
Printed in Germany